

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-327692

(43)Date of publication of application : 28.11.2000

(51)Int.Cl.

C07H 17/07

C12P 19/18

C12P 19/44

(21)Application number : 11-138923

(71)Applicant : EZAKI GLICO CO LTD

(22)Date of filing : 19.05.1999

(72)Inventor : OKADA SHIGETAKA
YONETANI TAKASHI
NISHIMURA TAKAHISA
NAKAE TAKASHI
TAKII HIROSHI

(54) NEW ISOFLAVONE DERIVATIVE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To improve the taste and solubility of an isoflavone derivative by allowing treating a glycosyltransferase to act on the isoflavone derivative.

SOLUTION: A glycosylisoflavone derivative comprises an isoflavone derivative to which equivalent or more moles of D-glucose residues are α -bonded. A glycosylisoflavone derivative comprises an isoflavone derivative which has a basic structure containing one β -bonded glucose in the molecule and to which equivalent or more moles of D-glucose residues are α -bonded. The isoflavone derivative is preferably daizin or genistin. The method for producing the glycosylisoflavone derivative comprises allowing a glycosyltransferase to act on a solution containing the isoflavone derivative and an α -glycosylsaccharide compound. The method for producing the glycosylisoflavone derivative comprises extracting the isoflavone derivative from soybeans or a soybean processed product in an alkaline solution having a pH value of ≥ 8 , adding the α -glycosylsaccharide compound to the extract, allowing the glycosyltransferase to act on the mixture to produce the glycosylisoflavone derivative, and then precipitating off impurities in an acidic state having a pH value of ≤ 5.5 .

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C): 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-327692

(P2000-327692A)

(43) 公開日 平成12年11月28日 (2000. 11. 28)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
C 0 7 H 17/07		C 0 7 H 17/07	4 B 0 6 4
C 1 2 P 19/18		C 1 2 P 19/18	4 C 0 5 7
19/44		19/44	

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平11-138923

(22) 出願日 平成11年5月19日 (1999. 5. 19)

(71) 出願人 000000228

江崎グリコ株式会社

大阪府大阪市西淀川区歌島4丁目6番5号

(72) 発明者 岡田茂孝

奈良県生駒市東生駒3-207-269

(72) 発明者 米谷 俊

兵庫県伊丹市東有岡1-18-13-A101

(72) 発明者 西村隆久

奈良市西大寺野神町1-7-10-5

(72) 発明者 中江貴司

兵庫県三田市すずかけ台3-4-1-H

501

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規イソフラボン誘導体

(57) 【要約】

【構成】 イソフラボン誘導体の味質と溶解性を改善する。

【効果】 糖転移酵素を作用させることでイソフラボン誘導体の味質と溶解性を改善する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 イソフラボン誘導体に等モル以上D-グルコース残基が α 結合したグリコシルイソフラボン誘導体

【請求項2】 分子内に β 結合したグルコースを1分子含む図1の基本構造を有するイソフラボン誘導体にD-グルコース残基が等モル以上 α 結合した請求項1記載のグリコシルイソフラボン誘導体

【請求項3】 イソフラボン誘導体がダイジンまたはゲニスチンであることを特徴とする請求項2記載のグリコシルイソフラボン誘導体

【請求項4】 請求項1-3のいずれかのイソフラボン誘導体と α -グリコシル糖化合物とを含有する溶液に、糖転移酵素を作用させる事の特徴とする請求項1-3のいずれかに記載のグリコシルイソフラボン誘導体の製造方法

【請求項5】 大豆または大豆加工品からpH8以上のアルカリ性溶液でイソフラボン誘導体を抽出し、 α -グリコシル糖化合物添加後に糖転移酵素を作用させグリコシルイソフラボン誘導体を生成した後pH5.5以下の酸性に保ち不純物を沈澱として除去することを特徴とする請求項4記載のグリコシルイソフラボン誘導体の製造方法

【請求項6】 大豆及び大豆加工品から熱水または有機溶媒でイソフラボン誘導体を抽出し、糖転移酵素を作用させグリコシルイソフラボン誘導体を生成した後pH5.5以下の酸性にするか冷却することにより不純物を沈澱として除去することを特徴とする請求項4記載のグリコシルイソフラボン誘導体の製造方法

【請求項7】 グリコシルイソフラボン誘導体を抽出した後pH8~10で α -グリコシル糖化合物と糖転移酵素を作用させ、しかるのちこれより低pHにて再度 α -グリコシル糖化合物と糖転移酵素を作用させることを特徴とする請求項4~6のいずれかのイソフラボン誘導体の製造方法

【請求項8】 請求項1-3のいずれかに記載のイソフラボン誘導体と、これにD-グルコース残基が等モル以上 α 結合したグリコシルイソフラボン誘導体を配合することによってイソフラボン誘導体の溶解度を改善した混合物

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は食品に含まれるイソフラボン誘導体の配糖体の製造に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 イソフラボンとは、狭義には3-フェニルクロモンを指し、この骨格の一部に各種官能基やグルコース等が結合した各種イソフラボン誘導体が一部の食品には含まれる。広義にはイソフラボン誘導体を包括してイソフラボン、あるいはイソフラボン化合物と示され

る場合もある。とりわけ大豆には多種のイソフラボン誘導体が含まれる。イソフラボン誘導体としては3-フェニルクロモンにグルコース1残基が β 結合した図1の骨格を持つ化合物が天然界には多く、その代表的なものとしてダイジン、ゲニスチン及びこれらのアグリコン(β 結合したグルコース残基がはずれたもの)としてダイゼイン、ゲニステインがある。ダイゼイン、ゲニステインはそれぞれ図2、図3に示す化合物である。イソフラボン誘導体にはエストロゲン様作用、抗菌作用、抗酸化作用、制ガン作用などの薬理効果があることが明らかとなっている。しかしながらこれらイソフラボン誘導体は非常に苦味が強い食品として使用するには好まれず、また水に対して難溶性であるため味の問題を克服したとしても食品に利用するには用途が極めて限定されていた。また、水に対する溶解性が悪いため、摂取しても十分に体内で薬理効果を発揮できないことが示唆された。したがっていかにこれらのイソフラボン誘導体の味質を改良し、また溶解性を改良して食品に利用できるようにして体内への吸収を改善し生理効果を高めるかが重要となっている。

【0003】

【本発明が解決しようとする課題】 さまざまな薬理効果がイソフラボン誘導体には報告されておりながら、従来、味質に問題があり、溶解性が悪いという問題が存在していたため、食品への実用はじゅうぶんになされていなかった。これらの問題を一掃したのが本願の発明である。さらに、溶解度を改良したイソフラボン誘導体を、不純物が大量に含まれる大豆の粗抽出物等から簡便に抽出する方法も確立した。なお本願においては以下単にイソフラボン誘導体という場合には、天然物由来のイソフラボン誘導体をさすものとする。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者はイソフラボン誘導体の味質、溶解性を改良する方法について鋭意検討した。結果、食品、とりわけ大豆あるいは大豆加工品をアルカリ溶液、または有機溶媒あるいは熱水で処理し、抽出液にpH8~10で α -グリコシル糖化合物と糖転移酵素を作用させイソフラボン誘導体に糖を転移させることで苦味が大きく抑制されたイソフラボン誘導体を製造できること、さらにこれらイソフラボン誘導体の糖転移物は非常に水溶性が高まっており、イソフラボン誘導体は従来酸性、中性で沈澱してしまっていたが、pHを5.5以下の酸性にしても沈澱しないことを発見した。これにより、イソフラボン誘導体の配糖体(以下、グリコシルイソフラボン誘導体という)を溶解させたまま、大量に含まれた高分子の蛋白等を沈澱として除去し、粗抽出物から容易に高濃度で高純度のグリコシルイソフラボン誘導体溶液を得られることを発見した。従来フラボノイドの配糖化は精製されたフラボノイドから行われていたが、蛋白などの不純物の多い大豆などが原料のイソフラ

ボン誘導体は、アルカリ抽出後に酸性又は中性に保って沈澱として得るという従来のフラボノイド精製法では蛋白などが同時に沈澱してしまうため精製が困難であった。したがってイソフラボン誘導体の配糖体も簡便、安価に得ることは困難であった。本発明により大豆などの粗抽出物から直接、蛋白等の不純物を除き簡便、安価にイソフラボン誘導体の配糖体を精製抽出して得ることが可能となった。さらに必要に応じて合成吸着樹脂に接触させ、次いで有機溶媒で溶出させることにより安価に効率よく高濃度で高純度のグリコシルイソフラボン誘導体を得られることを見出した。

【0005】糖転移酵素による配糖化をおこなうpHは、pH8以上10以下で酵素が作用できるpHを選択すればよいのだが、イソフラボン誘導体の収量を高める工夫として、アルカリ抽出ののちにpH8以上10以下いったん α -グリコシル糖化合物と糖転移酵素を作用させ、しかるのち一回目より低pH（7以上10以下）で再度 α -グリコシル糖化合物と糖転移酵素を作用させる方法がある。酵素の種類により耐アルカリ性は様々なので、酵素によりpHはこの範囲内で適宜選択すればよい。糖転移酵素の多くは至適pHは弱酸性から中性付近のため弱酸性から中性に近いpHで反応させれば配糖化反応が進行しやすいが、アルカリ抽出ののちにいきなり弱酸性から中性に近いpHとするとこの段階でイソフラボン誘導体が一部析出してしまうため、最終的なイソフラボン誘導体収量が減るからである。またpH8以上10以下で配糖化を一段階で行うのでもイソフラボン誘導体を従来の手法よりも簡便に高収率で得ることができるものの、アルカリ性が強いと酵素が失活しやすい。

【0006】好ましくはpH8以上10以下でいったん α -グリコシル糖化合物と糖転移酵素を作用させて、しかるのちいくぶん低pHに調整して（好ましくはpH7以上10以下）、再度 α -グリコシル糖化合物と糖転移酵素を作用させるとよい。これによって一回目の酵素反応で配糖体の生成が十分でない場合でも、共存する配糖体によって未反応のイソフラボン誘導体はpHを下げて難溶性のイソフラボン誘導体が可溶性の α -グリコシルイソフラボン誘導体の共存によって溶解度が上昇するため沈澱しにくくなる。これにより糖転移酵素が作用しやすいpHとして酵素反応を行うことで配糖化を十分に行うことができる。

【0007】以下に本発明を詳細に説明する。0.1N NaOH水に食品、とりわけ大豆およびおから等の大豆加工品を添加し、攪拌することによりイソフラボン誘導体を抽出する。抽出後、デキストリンを添加して溶解させ、酸性溶液によりpH8から10程度に調整した。このようにした溶液に α -グリコシル糖化合物、たとえば澱粉、アミロペクチン等と糖転移酵素、例えばサイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ若しくは、 α -アミラーゼ、 α -グルコシダーゼ、シュークロース

ホスフォリラーゼ等を添加しグリコシルイソフラボン誘導体を生成させた。糖転移反応終了後酸性溶液を添加しpHを5.5～3.0に調整した。この操作により水溶性の高まったグリコシルイソフラボン誘導体を析出させることなく大豆由来のタンパク質を沈澱とし、グリコシルイソフラボン誘導体及びその配糖体が高濃度溶解している溶液を得ることができた。より高濃度、高純度の精製品が必要な場合には合成吸着樹脂、例えば「ダイヤイオンHP」「デュオライトS」「アンバーライトXAD」等に吸着させ、エタノール等の有機溶媒で溶出すればよい。

【0008】尚配糖化反応ののちpHを酸性にした際、未反応の本来難溶性のイソフラボン誘導体がまざっていたとしても、析出することはない。これは配糖体との共存により本来難溶性のイソフラボン誘導体の溶解度が高まっているためと考えられる。また、イソフラボン誘導体とその配糖体の混合物はイソフラボン誘導体自身の苦味や体内への吸収性も改善しているのでとして食品等のかたちで提供してもよい。もちろん、配糖体の純品が必要であれば、ODSカラム等を用いてさらに精製することは可能である。

【0009】イソフラボン誘導体の抽出方法としては、アルカリによる抽出のほか熱水や有機溶媒を用いることも可能である。熱水抽出の場合、いったん溶出したイソフラボン誘導体が冷却により析出しないように耐熱性の糖転移酵素、たとえばサイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを高温で作用させることにより配糖体を得ることが可能である。有機溶媒による抽出の場合、酵素を有機溶媒中で作用させることにより配糖体を得ることが可能である。

【0010】本発明にいう大豆加工品とは、大豆粉、大豆胚軸、脱脂加工大豆、きな粉、豆乳、おから、味噌、納豆その他、大豆を原料とした製品全般をさす。本発明にいうイソフラボンとは3-フェニルクロモンであり、この骨格を有する化合物をイソフラボン誘導体と呼ぶ。本発明においては自然界に多く存在する図1のような骨格構造を有する化合物をはじめとする各種イソフラボン誘導体の物性改良を意図している。本発明でいうアグリコンとは図1の骨格構造を有するイソフラボン誘導体から β 結合したグルコース1分子が分離したフラボノイドをさす。本発明におけるグリコシルイソフラボン誘導体とは、イソフラボン誘導体のうち、分子内に水酸基を有する化合物にD-グルコース残基が等モル以上脱水縮合で α 結合したものである。 α 結合する位置はフェノール性水酸基であっても、たとえば図1のような骨格を有するイソフラボン誘導体の β 結合したグルコース中の水酸基であってもかまわない。酵素を選択することによってどちらにも α 結合させることが可能である。たとえば、グリコシルダイゼインの場合は図4のような構造で、R部分がD-グルコース残基が等モル以上 α 結合した構造

となっている。本発明における α -グリコシル糖化合物とは、分子内にD-グルコース残基が1分子あるいは2分子以上 α 結合した残基を有する物質をさす。

【0011】本発明の技術を、漢方薬をはじめとした各種有用物質の配糖体を動植物原料から簡便に製造し精製する方法にも応用することができる。具体的には大豆、大豆加工品、海參、五倍子、黄ごん、アロエ、地黄、薬用人参、芍薬、梔、甘草、柴胡、大黄、ドクダミ等より α -グリコシル基の結合する水酸基を有する構造の有用物質、すなわち β -G-イソフラボンのようなグルコース残基が1個 β 結合した形状の化合物のほか、たとえばグルクロン酸残基、ガラクトース残基、キシロース残基などを持つ配糖体であればよく、イソフラボノイド配糖体、フラボノイド配糖体、アントラセン配糖体、テルペン配糖体、カルコン配糖体、ステロイド配糖体、トリテルペノイド配糖体、アルカロイド配糖体、C-配糖体を有した有用物質の α -グリコシル化合物をさす。

【0012】

【実施例】次に実施例を示して本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれにより何ら制限される物ではない。

【0013】（実施例1）市販のおから1kgを10リットルの0.1N NaOH水に添加し攪拌した。300gデキストリンを添加し、ついで1N HClを添加しpHを9.1に調整したのちサイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを1000ユニット添加し、40℃で5時間放置した。さらにHClを添加しpH8.5に調整したのち、再度サイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを500ユニット添加し、40℃で16時間放置した。このこの酵素反応でイソフラボン誘導体が配糖化され、ダイゼインで約85%、ゲニスチンで約60%にグルコースが1から10個程度転移結合した一連の配糖体が合成されていた。さらにHClを添加しpHを4.2に調整しタンパク質を沈殿化した後、上清を回収した。この上清からダイジン配糖体約400mg、ゲニスチン配糖体約250mgを得た。

【0014】この方法で得たダイジン配糖体、ゲニスチン配糖体をさらにODSカラムを用いたHPLCにより精製し、C13-NMRによる分析を行った結果を表1に示す。これから明らかにようにダイジンモノグルコサイドとは、ダイジン中のグルコース残基の4位にグルコースが α -1,4結合した構造である。またダイジンダイグルコサイドとはダイジン中のグルコース残基の4位にマルトースが α -1,4結合した構造である。同様にゲニスチンモノグルコサイドとは、ゲニスチン中のグルコース残基の4位にD-グルコースが α -1,4結合した構造である。またゲニスチンダイグルコサイドとはダイジン中のグルコース残基の4位にマルトースが α -1,4結合した構造である。また、H1-NMRによっても、転移したD-グルコース残基の1位のカップリングコンス

タントがJ=3.7または3.5であったことより結合が α 結合であり、このことが裏付けられた。さらにFAB-MS分析によりこれらの分子量を測定したところ578, 740でありそれぞれダイジンモノグルコサイド、ダイジンダイグルコサイドであることが裏付けられた。同様にゲニスチンモノグルコサイド、ゲニスチンダイグルコサイドの分子量もそれぞれ594, 756であったことからこれらの構造も確認された。さらに本願方法により生成される一連の配糖体をTOF-MS分析により分子量を測定したところ、ダイジンおよびゲニスチンにD-グルコースが1から10個程度結合した構造を持つ一連の配糖体が生成されていることが示された。

【0015】

【表1】

分子数	416	578	740	432	594	756
物質名	ダイジン	ダイジンモノグルコサイド	ダイジンダイグルコサイド	ゲニスチン	ゲニスチンモノグルコサイド	ゲニスチンダイグルコサイド
2	113.1	153.2	153.2	154.4	154.3	154.4
3	123.6	123.6	123.7	122.5	122.6	122.6
4	174.6	174.6	174.7	180.4	180.3	180.4
5	126.8	126.9	126.9	161.5	162.0	161.6
6	115.5	115.4	115.5	99.5	99.6	99.5
7	161.3	161.2	161.2	162.9	162.8	162.8
8	103.4	103.3	103.4	94.5	94.1	94.4
9	156.9*	156.9*	157.0*	157.1*	157.2*	157.1*
10	118.4	118.5	118.5	105.0	106.2	106.1
1'	122.2	122.2	122.2	120.9	120.9	120.9
2'	129.9	129.9	130.0	130.0	130.0	130.0
3'	114.9	114.9	115.0	115.0	115.0	115.0
4'	157.2*	157.2*	157.2*	157.4*	157.5*	157.4*
5'	114.9	114.9	115.0	115.0	115.0	115.0
6'	129.9	129.9	130.0	130.0	130.0	130.0
glc-1	100	99.7	99.7	99.9	99.6	99.6
glc-2	73.1	72.7	72.7	73.0	72.6	72.6
glc-3	75.4	76.0	76.0	76.4	76.0	75.8
glc-4	69.4	78.9	79.0	69.6	78.9	79.0
glc-5	77.1	75.4	75.4	77.1	76.3	75.3
glc-6	60.6	60.2	60.3	60.6	60.1	60.2
glc-1'		100.6	100.4		100.6	100.1
glc-2'		72.4	72.4		72.4	71.7
glc-3'		73.2	73.2		73.2	73.1
glc-4'		69.9	79.4		69.9	79.4
glc-5'		73.4	73.4		73.4	71.9
glc-6'		60.8	60.3		60.6	60.2
glc-1''			100.7			100.7
glc-2''			72.6			72.5
glc-3''			72.9			73.2
glc-4''			70.0			69.9
glc-5''			73.2			73.4
glc-6''			60.8			60.8

【0016】（実施例2）市販のきな粉1kgを10リットルの0.1N NaOH水に添加し攪拌した。300gのデキストリンを添加し、ついで1N HClを添加しpHを9.1に調整したのちサイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを1000ユニット添加し、40℃で5時間放置した。さらにHClを添加しpH8.5に調整したのち、再度サイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを500ユニット添加し、40℃で16時間放置した。このこの酵素反応でイソフラボン誘導体が配糖化され、ダイゼインで約85%、ゲニスチンで約60%にグルコースが1から10個転移結合した一連の配糖体が合成されていた。さらにHClを添加しpHを3.5に調整しタンパク質を沈殿化した後上清を回収した。この上清からダイジン配糖体約500mg、ゲニスチン配糖体約300mgを得た。

【0017】（実施例3）実施例1及び2で得たダイジ

ン配糖体及びゲニスチン配糖体をODSカラムを用いたHPLC（ダイジン配糖体；アセトニトリル：水＝19：81、ゲニスチン配糖体；アセトニトリル：水＝22：78）によりダイジンモノグルコサイド、ダイジンダイグルコサイド、ゲニスチンモノグルコサイド、ゲニスチンダイグルコサイドを精製した。これらの配糖体の水に対する溶解度をダイジン、ゲニスチンと比較した。表2に示すように配糖化することで数百倍溶解度が上昇していた。

【0018】

【表2】

	溶解度 (mmol/L)	比
ゲニスチン	0.2	1.0
ゲニスチンモノグルコサイド	47.8	242.0
ゲニスチンダイグルコサイド	100.9	511.1
ダイジン	0.1	1.0
ダイジンモノグルコサイド	20.1	155.0
ダイジンダイグルコサイド	47.8	368.1

【0019】（実施例4）実施例1及び2で得たダイジン配糖体及びゲニスチン配糖体それぞれの1%溶液を作成した。これら配糖体1%溶液とダイジン及びゲニスチン1%溶液の苦味を熟練した11人の官能評価パネルによって判定した。その結果パネル全員が苦味が大きく軽減したと評価した。更にこの軽減効果に付随した効果と思われるいがらっぽさ等の嫌味の軽減が確認された。

【0020】（実施例5）大豆胚軸100gを300m

lの0.1N NaOH水に添加し攪拌した。90gのデキストリンを溶解した後、1N HClを添加しpHを9.1に調整したのちサイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを300ユニット添加し、40℃で5時間放置した。さらにHClを添加しpH8.5に調整したのち、再度サイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを200ユニット添加し、40℃で16時間放置した。このこの酵素反応でイソフラボン誘導体が配糖化され、ダイゼインで約85%、ゲニスチンで約60%にグルコースが1から10個程度転移結合した一連の配糖体が合成されていた。さらにHClを添加しpHを4.0に調整しタンパク質を沈澱化した後上清を回収した。この上清からダイジン配糖体約450mg、ゲニスチン配糖体約250mgを得た。

【0021】

【発明の効果】フラボノイド類の精製過程に糖転移酵素を作用させることで配糖化物を製造し、これによってフラボノイド類の味質と溶解性を改善した。

【0022】

【図面の簡単な説明】

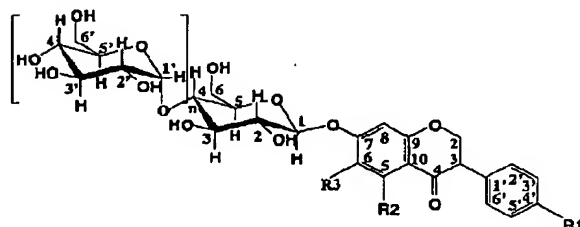
【図1】分子内にβ結合したグルコースを1分子含むイソフラボン誘導体骨格の構造

【図2】ダイゼインの分子構造

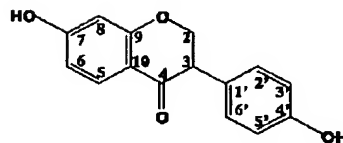
【図3】ゲニステインの分子構造

【図4】グリコシルダイゼインの分子構造

【図1】

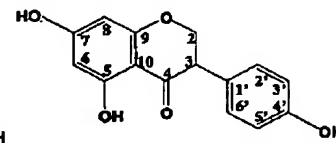


【図2】



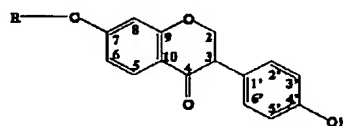
ダイゼイン

【図3】



ゲニステイン

【図4】



$n \geq 1$

R1: HまたはOH、R2: HまたはOH、R3: HまたはOCH₃

RはD-グルコースが1-10分子程度結合している

(6)

フロントページの続き

(72)発明者 滝井 寛
奈良県北葛城郡広陵町笠65-1

Fターム(参考) 4B064 AF41 CA11 CA21 CC03 CC07
CD06 CD19 CE08 CE10 DA01
DA10
4C057 BB02 DD01 KK01